

3-5 神経変性・発達障害の病因・病態・治療法開発研究

荒木 敏之

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第五部

1. 研究目的

本研究代表者らは 2020 年度まで実施した開発費研究 30-5「神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究」において、ALS をはじめとする神経変性疾患を対象とし、治療法開発のための製薬企業との共同研究への導出、もしくは、競争的外部研究費による支援を得る形での治療法開発研究に発展させることを目指した。これに続く本研究では、既に外部研究費の支援に発展させることができた一部の研究内容を除外する一方、神経突起構造の改変を伴う疾患として新たに発達障害機序に関する研究を加え、神経突起構造の改変に至る病態の共通メカニズムと各疾患に特異的なメカニズムの理解、更に、神経変性に対しては神経保護的疾患治療、発達障害に対しては異常構造の正常化のための最適な治療標的の明確化を達成し、疾患動物モデルを用いた治療モデルの作出を行う。また疾患動物モデルの解析のための最先端技術を本グループ内で共有し、機能的解析を充実させることにより研究の加速を図る。

2. 研究組織

主任研究者

荒木 敏之 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第五部 部長

分担研究者

青木 吉嗣 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

部長

大木 伸司 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部(免疫研究部) 室長

野口 潤 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 微細構造研究部 室長

大野 伸彦 自治医科大学医学部解剖学講座 教授

3. 研究成果

本研究参加者は、班会議や個々の研究者間の議論を通して交流を深め、分担研究者間の共同研究・研究費共同申請が既に複数件開始・進行している。

研究代表者グループでは、自閉症類縁疾患 (ASD) 様社会性行動障害を示す Na-H Exchanger(NHE)5 欠損マウスのフェノタイプ発現機序の検討として、レニン-アンギオテンシン系シグナルによる NHE5 分解機序が発達過程において生じる機序の解析を進めた。またヒト ASD 患者で今回初めて NHE5 遺伝子変異を同定したため、その変異による機能異常を細胞モデルにおいて明らかにした。

野口らは、本研究において、ASD におけるシナプス機能障害の理解を目指し、ASD 動物モデルでのシナプトソーム内の蛋白・核酸の体系的解析に基づく ASD 病態解析を行う。今年度は、主にマウスの脳からシナプトソームを精製する方法の最適化を行った。また、今年度論文発

表した研究の延長として、自閉症モデルマウスセット背内側前頭前皮質の興奮性神経細胞のシナプス後部である樹状突起スパインの2光子イメージングについて追加データの解析を進め、特にスパインとシナプス前部である軸索ブトンの安定性について解析を実施した。

青木らは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 患者における ASD 様症状の発症機序を、DMD モデルマウスの扁桃体基底外側核における脳型ジストロフィン Dp140 の局在と機能に着目して明らかにすることを目指している。今年度は、これまでの研究に引き続き、次世代プライス・スイッチ核酸の経静脈あるいは髄腔内投与により、ジストロフィン・アイソフォームの発現を回復させ、社会性異常等の脳症状を正常化できることを確認し、これまでの成果を論文する準備を進めた。

大木らは、これまでに二次進行型多発性硬化症において示した神経細胞障害性の Eomes 陽性ヘルパーT 細胞 (Eomes+Th 細胞) の役割に関する知見を他の神経変性疾患において検証することを目指し、本年度は、ALS およびアルツハイマー病モデルマウスを用いて、発症に伴う CNS への Eomes+Th 細胞の集積、慢性炎症環境下の神経細胞におけるレトロトランスポゾン L1 の脱抑制 (再活性化)、L1 由来タンパク質による Eomes+Th 細胞の活性化を示した。

大野らは、本グループにおける電顕的微小構造観察のサポートを行うが、自らの研究としては、髄鞘関連疾患の軸索変性および再髄鞘化による組織再生に着目し、ミトコンドリアの動態と機能、そしてミトコンドリアと小胞体の相互作用 (MAM) の構造の制御と役割を、3次元超微形態解析技術や新たな標識・操作技術の開発と応用を通じて明らかにすることを目指している。今年度は、オリゴデンドロサイトが髄鞘を形成する軸索の特性を電子顕微鏡による3次元再構築技術を用いて検討し、その形態的特性を明らかにした。

4. 研究成果刊行一覧

Wakatsuki S, Araki T.

Novel Molecular Basis for Synapse Formation: Small Non-coding Vault RNA Functions as a Riboregulator of MEK1 to Modulate Synaptogenesis *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14: 748721, 2021.

Nagano S, Araki T.

Axonal Transport and Local Translation of mRNA in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14: 697973, 2021.

Wakatsuki S, Ohno M, Araki T.

Human vault RNA1-1, but not vault RNA2-1, modulates synaptogenesis *Communicative & Integrative Biology* 14(1) 61-65, 2021.

Wakatsuki S, Takahashi Y, Shibata M, Araki T.

Selective phosphorylation of serine 345 on p47-phox serves as a priming signal of ROS-mediated axonal degeneration *Experimental Neurology* 352: 114024, 2022.

Hohjoh H, Raveney B, Yamamura T, Hayashi N, Oki S

Immune-mediated neurodegenerative trait provoked by multimodal derepression of long-interspersed nuclear element element-1. Takahashi F, Zhang C, *iScience* 25, 104278, 2022.

Watanabe S, Kurotani T, Oga T, Noguchi J, Isoda R, Nakagami A, Sakai K, Nakagaki K, Sumida K, Hoshino K, Saito K, Miyawaki I, Sekiguchi M, Wada K, Minamimoto, Ichinohe N Functional and molecular characterization of a non-human primate model of autism spectrum disorder shows similarity with the human disease. *Nat. Commun.* 2021: 12: 5388.

Ucar H, Watanabe S, Noguchi J, Morimoto Y, Iino Y, Yagishita S, Takahashi N & Kasai H. Mechanical actions of dendritic-spine enlargement on presynaptic exocytosis.

Nature. 2021; 600: 686–689.

Chesshyre M, Ridout D, Hashimoto Y, Ookubo Y, Torelli S, Maresh K, Ricotti V, Abbott L, Gupta VA, Main M, Ferrari G, Kowala A, Lin YY, Tedesco FS, Scoto M, Baranello G, Manzur A, Aoki Y, Muntoni F. Investigating the role of dystrophin isoform deficiency in motor function in Duchenne muscular dystrophy.

J Cachexia Sarcopenia Muscle.13:1360-1372. 2022.

Sathyaprakash C, Kunitake K, Aoki Y.

Editorial: Challenges and Opportunities for Neuromuscular Disease Modelling Using Urine-derived Stem Cells.

Front Physiol.13:848220. 2022.

Aoki Y, Wood MJA.: Emerging Oligonucleotide Therapeutics for Rare Neuromuscular Diseases.

J Neuromuscul Dis. 8(6):869-884. 2021.

橋本泰昌, 青木吉嗣

特集 新組織学シリーズII:骨格筋-今後の研究の発展に向けて III.骨格筋を障害する疾患の注目すべき病態 デュシェンヌ型筋ジストロフィーの中樞神経障害.

生体の科学 72(6) 565-568. 2021.

橋本泰昌, 國石洋, 関口正幸, 青木吉嗣.

エクソン 53 スキップ療法は DMD モデルマウスの社会性行動異常と扁桃体シナプス異常を改善させる.

神経治療学 38(6) S287-S287 2021.

橋本泰昌, 青木吉嗣.

Duchenne 型筋ジストロフィーのエクソン・スキップ治療.

神経治療学 38(3) 270-273. 2021

Tanaka T, Ohno N, Osanai Y, Saitoh S, Thai TQ, Nishimura K, Shinjo T, Takemura S, Tatsumi K, Wanaka A.

Large-scale electron microscopic volume imaging of interfascicular oligodendrocytes in the mouse corpus

callosum.

Glia. 69:2488-2502. 2021

Yamazaki R, Osanai Y, Kouki T, Shinohara Y, Huang JK, Ohno N.

Macroscopic detection of demyelinated lesions in mouse PNS with neutral red dye.

Sci Rep. 11:16906. 2021

大野伸彦, 齊藤百合花, 長内康幸, 山崎礼二, 篠原良章

ボリューム電子顕微鏡イメージングにおける組織細胞化学の特徴、組織細胞化学 2021、163-174、2021

大野伸彦

有髄軸索におけるミトコンドリア恒常性維持のメカニズム

ミトコンドリアダイナミクス ~機能研究から疾患・老化まで~, 17-26、2021.

分担研究報告書

(課題名) 神経変性・発達障害の病因・病態・
治療法開発研究

(所属) 国立精神・神経医療研究センター 神
経研究所疾病研究第五部

(氏名) 荒木 敏之

緒言

本研究では、2020年度まで実施した「神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究」においては対象とした研究のうち、競争的外部研究費による支援を得る研究として発展させることができた、Nicotinamide 類縁化合物による神経保護に関する開発研究を除外する一方、神経突起構造の改変を伴う疾患として新たに ZNRF1 の発達期における機能に関する研究を加え、神経突起構造の改変に至る病態の共通メカニズムと各疾患に特異的なメカニズムの理解、更に、神経変性に対しては神経保護的疾患治療、発達障害に対しては異常構造の正常化のための最適な治療標的の明確化を達成し、疾患動物モデルを用いた治療モデルの作出を行う。

方法

開発費 30-8 研究を引継ぎ、本研究では特に疾患動物モデルを用い、動物個体レベルでの解析を通して、病態を理解することを目指した研究を行う。

1) NHE5 機能低下と ASD 様フェノタイプを関連付けるメカニズムの研究において、妊娠時高血圧が ASD リスク因子となる機序に関しては、renin-angiotensin 過剰発現による高血圧モデルマウスを用いた検討を進め、妊娠時高血圧による産仔の社会性行動異常をモデル動物レベルで示すとともに、分子機序に関する研究を更に進める。

2) 神経細胞に広範に発現し、特に発達期に高レベルの発現を示すユビキチンリガーゼ ZNRF1 に関して、その神経発達過程における機能を、特に ZNRF1 欠損マウスが示す行動異

常に着目しつつ明らかにする。

結果

1) Na-H 交換体ファミリーメンバーである NHE5 は、主として神経細胞に発現し、細胞内では Endosome/Lysosome の膜上に主としては限している。NHE5 欠損マウスは自閉症様と考えられる社会性行動異常を示す。これまでの検討により、今年度の研究において、NHE5 の欠損や機能低下による Lysosome 分解低下により、シナプス関連蛋白のリサイクリングが低下すること、それによって樹状突起スパインの未熟化をきたすことを示した。今年度、自閉症類縁疾患患者の遺伝子解析において、ヒト NHE5 (Slc9A5) 遺伝子に変異のある 1 例を同定した。この変異は、膜貫通領域中に存在する、異なる NHE ファミリーメンバー間で高度に保存された残基であり、この残基の変異は膜を介したイオンの輸送に関連することが想定される。

2) ZNRF1 は神経細胞に広範に発現するユビキチンリガーゼであり、軸索損傷にともなって活性化し、Akt を基質として分解する機能を介して、細胞骨格の分解制御を行い、軸索構造の安定性維持・制御に寄与していると考えられている。一方、ZNRF1 欠損マウスは成長、生殖などに問題なく、脳の発生にも gross な異常を示さないが、行動解析バッテリーによる網羅的な行動解析を実施したところ、open field test、social interaction tests、acoustic startle response、prepulse inhibition、fear conditioning などの行動指標において異常を示したため、総合的には精神疾患様行動異常であると判断している。ZNRF1KO のこうした中枢神経フェノタイプに関連する機能が、ユビキチンリガーゼとしてどのような蛋白を分解する活性と関係しているのかを明らかにするため、ZNRF1KO における蛋白発現を網羅的に検討し、複数の候補蛋白を同定した。また、ZNRF1KO の行動フェノタイプを惹起する可能性のある神経回路の同

定と、その回路における生理学的異常の同定のための検討を開始した。

考察

1) ヒトにおける NHE5 遺伝子の変異はこれまでに報告されていなかった。今回、我々が同定した変異は、上述のように、Na-H 交換体としての機能に影響を及ぼす可能性の高い変異であり、今後実際にそのような影響があるかについては検討を行う予定であるが、一方、この患者は NHE5 以外に EHMT1 遺伝子にも変異を有しており、EHMT1 変異のみでも自閉症類縁疾患を惹起しうることから、今回同定した NHE5 遺伝子変異のヒト疾患における意義は不明であると言わざるを得ない。

2) ZNRF1 依存的 Akt 分解は、我々自身の検討において、Adult の神経細胞では平時には不活性であることが明らかとなっており、本研究では Akt 以外の別の基質を同定するための検討を開始した。一方、Akt を分解することによって精神機能異常を説明できる可能性も残されているが、その場合には、神経回路形成期など特定のタイミングで、また、特定の神経回路において ZNRF1 のユビキチンリガーゼ活性の ON/OFF を制御するメカニズムが存在する必要がある。今後、このような機序に関しても検討を行うことを考えている。

参考文献 (業績)

Wakatsuki S, Araki T.
Novel Molecular Basis for Synapse
Formation: Small Non-coding Vault RNA
Functions as a Riboregulator of MEK1 to
Modulate Synaptogenesis
Frontiers in Molecular Neuroscience 14:
748721, 2021.
Nagano S, Araki T.
Axonal Transport and Local Translation of
mRNA in Neurodegenerative Diseases.

Frontiers in Molecular Neuroscience 14:
697973, 2021.

Wakatsuki S, Ohno M, Araki T.
Human vault RNA1-1, but not vault RNA2-1,
modulates synaptogenesis

Communicative & Integrative Biology 14(1)
61-65, 2021.

Wakatsuki S, Takahashi Y, Shibata M, Araki
T.

Selective phosphorylation of serine 345 on
p47-phox serves as a priming signal of
ROS-mediated axonal degeneration

Experimental Neurology 352: 114024, 2022.

分担研究課題名：神経変性疾患の免疫応答
依存的な病態機序の研究

名前：大木 伸司

所属：神経研究所免疫研究部

緒言：神経変性疾患の病態解明はいまだ不十分であり、病態機序の根本的な捉え直しが必要である。近年、その原因の一つとして中枢神経系(CNS)内の神経炎症が注目されているが、炎症組織には常に免疫細胞が集積し、病態に干渉する。私たちは、二次進行型多発性硬化症 (SPMS) およびそのマウスモデルの神経変性過程に、Eomes 陽性ヘルパーT細胞 (Eomes+Th細胞) が中心的な役割を果たすことを見出した。その後、筋萎縮性側索硬化症(ALS)やアルツハイマー型認知症(AD)の患者や、対応するマウスモデルでも Eomes+Th細胞の有意な増加が確認され、同細胞による神経細胞障害が、広範な神経変性病態に関わることが予想される。本研究では、SPMS、ALS、AD のモデルマウスを用いて、Eomes+Th細胞による神経細胞障害の分子機序の全容解明を行う。既存の解釈の枠を超えた、全く新しい病態機序の解明と、画期的な治療法につながる基礎データの取得を目指す。

方法：① mSOD1 マウスおよび 5xFAD マウスの CNS における Eomes+Th細胞の浸潤を、フローサイトメーターを用いて定量し、病態との関連を明らかにする。② 上記の3種の病態モデルマウスを対象として、Eomes+Th細胞の活性化に関わるプロトタイプ抗原の探索を進める。同定したプロトタイプ抗原について、発現細胞の同定や発現様式の分子機序の解析を行い、病態との

関連を明らかにする。③ プロトタイプ抗原の刺激を受けて活性化した Eomes 陽性 Th細胞が、神経細胞障害因子であるグランザイム B 産生を引き起こすか、共培養により直接神経細胞を障害するかを明らかにする。

結果：① 病態が顕著に進行する 16 週齢の mSOD1 マウス CNS 内には、Eomes+Th細胞の顕著な浸潤が認められ、エンドステージの 20 週齢以降まで持続した。病態が顕著に進行する 6 ヶ月齢の 5xFAD マウス CNS 内には、Eomes+Th細胞の顕著な浸潤が認められ、15 ヶ月齢ではその頻度がさらに上昇した。② 予想されるプロトタイプ抗原の特性と既報のデータの考察から、単一遺伝子から派生しゲノム内で最大のコピー数 (~ 5×10^5 copy/genome) からなるレトロトランスポゾン LINE-1 (以下 L1) に着目し、L1 タンパク質の一つである ORF1 が、CNS 浸潤 Th細胞の Ca^{2+} influx (T細胞受容体刺激の指標) を誘導することを見出した。③ SPMS マウスと mSOD1 マウスの脊髄神経細胞では、発症に伴って L1 発現が顕著に亢進した。一方、各マウスの L1 発現の分子機序は大きく異なり、SPMS マウスでは Foxa1 発現によるクロマチン弛緩と、キヌレニンによる芳香族炭化水素受容体(AhR)の活性化が L1 発現を誘導した。一方、mSOD1 マウスでは、成熟神経細胞の細胞周期の部分的な亢進が、L1 発現と強く相関していた。④ 3種の神経変性モデルマウスの CNS から分離した Th細胞を、ORF1 を取り込ませた骨髄由来樹状細胞と共培養すると、ELISpot アッセイによるグランザイム B 産生細胞数が有意に増加した。さらにこれらの CNS 由来 Th細胞を、C57BL/6 マウス

胎児の海馬から調製した初代培養神経細胞と共培養すると、培養 72 時間後の生細胞数が有意に減少した。

考察：複数の神経変性疾患モデルマウスにおいて、① 発症に伴って CNS 内に Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤が増加すること、② 各マウスの神経細胞において、プロトタイプ抗原 ORF1 のソースとなる L1 遺伝子の発現が、発症に伴って亢進すること、③ CNS 由来 Th 細胞のグランザイム B 産生が、ORF1 刺激により確かに増強し、CNS 由来 Th 細胞自体が神経細胞障害性を示すこと、がそれぞれ明らかとなった。したがって本研究の結果から、Eomes 陽性 Th 細胞による免疫依存性神経細胞障害が、多様な神経変性病態に普遍的に関与する可能性が示され、プロテノパチーによる神経細胞死とは異なる新しい神経細胞障害機序を明らかにした。この免疫依存性神経細胞障害は、先行する神経細胞死が引き起こし、病変部位の伝播、拡大に関わるものと予想される。さらに、一連の反応は神経変性疾患モデルマウスごとにわずかに異なることも明らかとなり、各疾患に特異的な病態を反映するものと考えられた。一方、免疫依存性神経細胞障害は、先行する神経細胞死による抗原の供給がなければ作動しないため、今後、先行する自律的神経細胞死との関連を明らかにしていく予定である。

結論：免疫依存性神経細胞障害が、全く新しい病態機序として神経変性疾患の病態形成に普遍的に関わり、とくに病変部位の伝播、拡大を引き起こす可能性が示された。

参考文献： Immune-mediated neurodegenerative trait provoked by multimodal derepression of long-interspersed nuclear element. Takahashi F, Zhang C, Hohjoh H, Raveney B, Yamamura T, Hayashi N, Oki S. *iScience* 25, 104278, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104278>, (2022).

神経筋疾患の中樞神経障害に対する遺伝子 治療法開発

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
青木 吉嗣

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の 30%程度に合併する自閉症スペクトラム様の脳症状については、ADL を著しく下げる一因であるにも関わらず、病態理解が不十分であり治療法が確立されていない。2019-2020 年度は精神・神経疾患研究開発費「神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究」班 (班長: 荒木敏之) では、DMD で自閉症スペクトラム様の精神症状が発症する分子機序の一端を、DMD モデルマウスの扁桃体基底外側核における脳型ジストロフィン Dp140 の局在と機能に着目して明らかにした (論文投稿中)。しかしながら、Dp140 の欠損により、認知・情動機能の異常が生じる神経生理基盤の詳細は未だ明らかではない。本研究では、ジストロフィン欠損に伴うマウス脳解析の継続に加えて、ヒト尿由来細胞から作製した 3D 人神経細胞培養系で再現させ得るかどうかを検討する。

方法

1. DMD モデルの mdx および mdx52 マウス、野生型 C57BL/6J マウスを用いる。
2. 前述マウスを対象に、社会性に重要な神経核である扁桃体・基底外側核における錐体神経細胞での電気生理学的解析および分子生物学的解析を実施する。
3. 前述マウスの扁桃体を対象に、エクソン 53 スキップによる Dp140 の発現回復により自閉スペクトラム様の症状が改善するかを検討する。

結果

1. mdx52 マウス扁桃体では、シナプス前終

末に局在する小胞型グルタミン酸トランスporter 発現レベルが有意に低下していた。

2. 扁桃体・基底外側核における錐体神経細胞を対象に、whole-cell パッチクランプを実施したところ、mdx52 マウスでは、mdx マウスあるいは野生型と比べて、錐体神経細胞における神経活動の興奮性・抑制性シナプス後電流の振幅の比が有意に低下 (E/I バランス異常) し、mEPSC の頻度異常を認めた。
3. モルフォリノ・アンチセンス核酸医薬を mdx52 マウスの脳室内に反復投与すると、扁桃体でエクソン 53 スキップ誘導により Dp140 が発現回復し、社会性異常等の脳症状と E/I バランス異常は改善した。

考察

DMD の脳症状はシナプス異常に基づき、可逆的であることが示唆された。エクソン・スキップによる脳ジストロフィン発現回復は治療法として有望な可能性がある。

結論

マウス脳からの Dp140 欠損により、マウス扁桃体・基底外側核の錐体神経細胞シナプス前終末におけるグルタミン酸放出を低下させ、社会的コミュニケーション能力の異常につながることを、さらに前述の異常所見はエクソン・スキップによる Dp140 の発現回復により正常化することが示唆された。

参考文献

1. Hashimoto et al., Autism-like behavior associated with a lack of short dystrophin Dp140 isoform in the amygdala of dystrophic mouse models. Under review.

分担研究報告

2022年5月12日

分担研究課題名：樹状突起スパインの分子解析による自閉スペクトラム症病態の研究

名前：野口 潤

所属：神経研究所 微細構造研究部

緒言：自閉スペクトラム症（以下自閉症）に関係する遺伝子は数百以上が知られており、自閉症の大半を占める特発性自閉症は common variant と呼ばれる、通常発達の人にも共通して見られる遺伝子変異が重複して発生し、それに環境要因が加わることで生じると想定される。自閉症関連遺伝子は、シナプス関連遺伝子とその発現の制御を行う遺伝子が多く含まれる。また、自閉症患者とほとんどの自閉症モデル動物に共通してみられる特徴として、シナプス形態の変化があり、シナプスダイナミクスの変異は7種類以上の自閉症モデル動物に共通して報告されている。

我々は、ヒト特発性自閉症に最も近い動物モデルの一つであるバルプロ酸(VPA)曝露自閉症モデルマーモセットを用いて解析を行っている。このモデルマーモセットにおいて、スパイン密度の発達の変異とシナプス機能の変異が成長期に同じように推移していた。また、発達期の遺伝子発現の推移もヒト自閉症と類似していることなどを報告してきた。このモデルのシナプスダイナミクスのさらなる特徴解析を行うことを目的に、今回 adult 動物の興奮性スパインシナプス形態変化について解析した。また、蛍光タンパク質の発現を指標として神経回路特異的なシナプトゾームを抽出してシナプス含有物質を取得する方法論の開発を実施した。

方法：南米由来の新世界サルであるマーモセ

ットはラット程度の体重で飼育しやすく、他の霊長類に比べて繁殖力が高い。ヒトと共通の脳構造を有しており、げっ歯類よりも発達した前頭前皮質を持つ。家族を中心とした群れを作って生活しており、社会性とその変容の解析に有利と思われる。

我々は妊娠60日のマーモセットにバルプロ酸(VPA)を経口投与し、出生した仔マーモセットをVPA曝露自閉症モデル（以下VPAマーモセット）として使用した。

成体マーモセットにアデノ随伴ウイルス(AAV)を接種して蛍光タンパク質を社会性に関連する大脳皮質背内側前頭前野(dmPFC)の神経細胞において発現させた。その後、頭蓋骨に観察窓を設け、大脳皮質2/3層の錐体細胞を2光子顕微鏡を用いて観察した。シナプス後部である樹状突起スパインやシナプス前部である軸索ブトンを3日毎に観察した。データ取得後、スパインやブトンの生成・消去などのダイナミクスの定量化を実施した。

また、摘出した脳をホモジナイズし、シナプト前部とシナプス後部が含まれる小胞であるシナプトゾームを抽出できることが知られている。シナプトゾームを抽出して包含される分子を解析することで、シナプスに含まれる分子を解析できる。今回蛍光を指標として、フローサイトメーターを用いて、蛍光タンパク質を発現したシナプトゾームを分離して、特定の神経回路に特異的なシナプトゾームを濃縮することを試みた。

結果：特発性ASDの改良型モデルであるVPAマーモセットにおいて、前頭前野の第2/3層錐体細胞の tuft 樹状突起におけるシナプスのターンオーバーを in vivo 2光子イメージングにより観察した。本研究により、(1) VPAマーモセットではシナプスのターンオーバーが

亢進していることが示された。また、(2)VPA マーモセットでは、新たに発生したスパインが3 ミクロン以内に近接してクラスターを形成する傾向があった。(3)VPA マーモセットでは、生成スパインのうち、新たに安定化したスパインの数がコントロール群より多かった。その差は特にクラスター化したスパインで大きかった。これらの結果は、VPA マーモセットにおいて、シナプスの安定性とシナプス間相互作用に不応があることを示唆している。(4)また、オキシトシンを鼻腔投与することにより新生スパインのクラスター形成は抑制される傾向を見出した。

次に、シナプスの性質を分子的に解析するため、シナプトゾームの抽出の条件検討を実施した。溶液を含めてシナプス後部がより保存される条件を採用した。また、フローサイトメーターを用いて、蛍光タンパク質発現を指標として、シナプトゾームの濃縮が可能であることを確認した。

考察：これまでいくつかのモデルマウスにおいて、スパインターンオーバーの亢進が報告されてきたが、ヒト特発性自閉症に近い動物モデルである VPA マーモセットモデルにおいてそれが見出されたことは意義がある。さらに今回新生スパインのクラスター化が見出された。シナプス可塑性刺激によって BDNF や Ras などのシナプス可塑性に関連する物質が周囲のスパインに拡散することが報告されている。拡散した物質が近隣のスパイン新生を助けクラスター化する可能性がある。クラスター化することにより、神経回路が冗長となり、より頑強で効率の良い学習を可能にする場合があることが考えられる。実際に VPA マーモセットは空間学習のオペラント学習課題で成績が対照群よりも良く、その後の逆転

学習では成績が悪くなることが微細構造研究部から報告されている。社会性に関する学習経験後のシナプスの状態について今後解析したいと考えている。

結論：今回我々は VPA マーモセットにおけるシナプスのダイナミクスの異常、シナプスターンオーバーの亢進や、新生スパインのクラスター形成の促進などを見出した。シナプスターンオーバーやスパインクラスタリングの亢進は記憶・学習との関連が報告されている。ヒトにおいても社会性の制御と関係するとされるオキシトシンは新生スパインのクラスター形成の抑制作用を示した。

今後、シナプトゾームを抽出し蛍光を指標とした分離法を用いて神経回路特異的にシナプスにおける分子を解析する。社会的な学習・経験の後やオキシトシン投与後に解析を行うことで、自閉症の病態に関連するシナプスダイナミクス異常の分子的基盤を探索する。

参考文献：

1. Watanabe S, et al.. Nat. Commun. 2021; 12: 5388. Doi: 10.1038/s41467-021-25487-6.

分担研究課題名

軸索変性に伴うオルガネラ動態・相互作用の変化とその制御機構の解明

名前：大野伸彦

所属：自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門

緒言：

中枢神経系の髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトは突起を伸ばして複数の軸索に対して髄鞘を形成する。髄鞘の遺伝子異常は被覆された軸索のオルガネラ異常や変性を惹起するが、どの軸索が髄鞘によって被覆され、そして障害の影響を受けるのかについては、ほとんどわかっていなかった。そこで2021年度は、オリゴデンドロサイトが髄鞘を形成する軸索の特性を電子顕微鏡による3次元再構築技術を用いて検討した (Tanaka et al. 2021)。

また、2021年度は脱髄病変の解析効率を高める技術開発の中で、これまでの研究で用いていた中枢神経系の脱髄病変検出法である Neutral red による染色法を初めて末梢神経へと応用し、末梢神経系の脱髄病変を目視で検出できる技術の開発を目指した (Yamazaki et al. 2021)。

方法：

マウスの脳梁から2000枚の連続電子顕微鏡画像を Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy を用いて取得し、含まれるすべての細胞を同定し、11個のオリゴデンドロサイトの細胞体、核、そして追跡可能な全ての突起を抽出した。その後、新たに開発した Outer tongue を使ったオリゴデンドロサイトの形成する髄鞘の同定法を用いて、各オリゴデンドロサイトが形成する髄鞘を正確に同定し、被覆される軸索、形成される髄鞘の形態学的特性を解析した。

Neutral red による新規検出法の開発では、マウス坐骨神経にリゾレシチンを注射して7~21日後に Neutral red を腹腔内投与し、病側と対側 (コントロール) の坐骨神経を採取後、肉眼観察もしくは免疫染色および電子顕微鏡を用いて、Neutral red の分布および脱髄・再髄鞘化について評価した。

結果：

連続電顕画像の解析から、オリゴデンドロサイトはすべての細胞で明瞭な極性を有し、細胞体の一側にある、オルガネラが豊富な領域から太い突起を伸ばしていた。また、各突起によって形成される髄鞘の厚みとその被覆される軸索の径は、オリゴデンドロサイト毎に偏っていることが分かった。

結果：

また、連続電顕画像上で3次元再構築されたオリゴデンドロサイトの髄鞘にランビエ絞輪を隔てて隣接する髄鞘を同定し、その厚みと軸索径を比較した。その結果、隣り合う髄鞘の厚み、そしてその部位の軸索径には明らかな相関関係が見られた。

Neutral red 標識の観察では、リゾレシチン投与7日後 (dpl) に坐骨神経に脱髄が生じ、この脱髄病変が容易に検出できることを明らかにした。7日目から21日目にかけての再髄鞘化過程では、Neutral red 標識は徐々に減少した。Neutral red は病巣の活性化マクロファージとシュワン細胞を標識していた。7日後の標識坐骨神経を電子顕微鏡で解析したところ、病変部には脱髄とミエリン残渣が確認された。

考察：

各軸索は、ランビエ絞輪を隔てられた複数の髄鞘によって被覆されている。本研究の観察から、1本の軸索上の各髄鞘は異なるオリゴデンドロサイトによって形成されていることがほとんどであったことから、オリゴデンドロサイト毎にその形成する髄鞘の厚みや軸索の径に偏りがあれば、ランビエ絞輪を隔てた隣の髄鞘の厚みや軸索の径はばらつく可能性が考えられる。しかし、各軸索は異なるオリゴデンドロサイトによって被覆される領域間においても同様の径を有しており、またそれらの髄鞘の厚みも同様であると示唆された。得られた結果を総合すると、個々のオリゴデンドロサイトは同じような径と髄鞘厚を有する軸索群に選択的に髄鞘を形成していると考えられた。

また、Neutral red 標識は、リゾレシチン注入後の坐骨神経における脱髄病変を巨視的に検出することができる簡便な方法であった。この方法は、末梢神経系の再髄鞘化の分子機構の解明や、再髄鞘化を促進する薬剤のスクリーニングに応用できる可能性がある。また、Neutral red は脱髄部位の反応性の Schwann 細胞とマクロファージを標識していると考えられたことから、これらの細胞がみられるその他の病変部位の検出にも応用できる可能性も示唆された。

結論：

今年度の結果から、個々のオリゴデンドロサイトは同じような径と髄鞘厚を有する軸索群に選択的に髄鞘を形成していることが明らかになり、また、Neutral red の応用による末梢脱髄病変の検出法の開発にも成功した。オリゴデンドロサイト単位の髄鞘の異常によって惹起される軸索のオルガネ

ラ異常や軸索変性の分布が、こうした選択性による制御を受けている可能性が示唆されるとともに、Neutral red による脱髄病変検出法は他の原因による病変検出にも応用できる可能性が示唆された。

今後は髄鞘疾患モデルや加齢において、髄鞘形成細胞による髄鞘形成の異常、さらには髄鞘の細胞単位の形態学的特性が障害される可能性について検討を進める。また、オルガネラ動態変化の影響など、そのメカニズムの解明を目指し、ミトコンドリア分裂や代謝状態の制御による、髄鞘疾患の軸索変性の変化、および髄鞘形成の改善の可能性についても、検討を進める。

参考文献：

1. Tanaka T, Ohno N, Osanai Y, Saitoh S, Thai TQ, Nishimura K, Shinjo T, Takemura S, Tatsumi K, Wanaka A. Large-scale electron microscopic volume imaging of interfascicular oligodendrocytes in the mouse corpus callosum. *Glia*. 2021 69:2488-2502. doi: 10.1002/glia.24055.
2. Yamazaki R, Osanai Y, Kouki T, Shinohara Y, Huang JK, Ohno N. Macroscopic detection of demyelinated lesions in mouse PNS with neutral red dye. *Sci Rep*. 2021 11:16906. doi: 10.1038/s41598-021-96395-4.

Etiology, pathogenic mechanism, and developing therapeutic approach for neurodegenerative diseases and neurodevelopmental diseases.

Toshiyuki Araki

Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience,
National Center of Neurology and Psychiatry

Aims

In our former project for the Intramural Research Grant for Neurological and Psychiatric Disorders (30-5: Research for developing neuroprotective therapy against neurodegenerative diseases via elucidation of pathogenetic mechanism) lasted till 2020, our disease target was neurodegenerative diseases including amyotrophic lateral sclerosis, and we aimed to develop our research into collaboration with pharmaceutical companies for therapeutic development, or to be supported by external competitive research funding programs for development of therapeutics. In the current research project that follows 30-5, we excluded some research contents that have already acquired external research fund support successfully, and newly included research on mechanism of developmental disorders as another type of diseases involving alteration of neurite structures. In this research project, we aim to understand the pathogenic mechanisms shared by our target diseases as well as the mechanisms that are specific to certain type of diseases leading to the alteration of neurite structures. To develop therapeutic approaches against neurodegenerative diseases and neurodevelopmental abnormalities, we aim to clarify the optimal treatment targets and generate treatment model using diseased animal models. We will also share cutting-edge technologies for the analysis of diseased animal models within the group to expedite functional analysis and accelerate our research.

Research Team

-Leader

Toshiyuki Araki: Director, Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (leader of this team)

-Participants

Yoshitsugu Aoki: Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience,

National Center of Neurology and Psychiatry

Shinji Oki: Section chief, Department of Immunology, National Institute of Neuroscience,
National Center of Neurology and Psychiatry

Jun Noguchi: Section Chief, Department of Ultrastructural Research, National Institute of
Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

Nobuhiko Ohno: Professor, Department of Anatomy, Jichi Medical University